

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: C12N 15/29, 15/82, C07K 14/415, C12N 5/10, A01H 5/00, 5/10		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/46759 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Oktober 1998 (22.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01070 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. April 1998 (15.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 15 700.9 15. April 1997 (15.04.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: THERES, Nikolaus [DE/DE]; Schiffsgesweg 30, D-50259 Pulheim (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: PLANTS WITH CONTROLLED SIDE-SHOOT FORMATION AND/OR CONTROLLED ABSCISSION AREA FORMATION (54) Bezeichnung: PFLANZEN MIT GESTEUERTER SEITENTRIEBBILDUNG UND/ODER GESTEUERTER ABSCISSIONSZONENBILDUNG (57) Abstract <p>Disclosed are nucleotide sequences coding polypeptides which are responsible for controlling side-shoot formation and/or petal formation and/or abscission area formation, in addition to polypeptide and amino acid sequences coded by nucleotide sequences. Disclosed are also plants with controlled side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas, wherein the expressible DNA sequence, fragment or derivative thereof responsible for side-shoot formation and/or petal formation and/or abscission area formation is integrated in a stable manner into the genome of the plant cell or the plant tissue. Further disclosed are methods for the production of plants with controlled side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas, wherein the expressible DNA sequence or fragment or derivative thereof responsible for side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas is integrated in a stable manner into the genome of plant cells or plant tissue and the plant cells or plant tissue thus obtained is regenerated to form plants. The invention also relates to plants and the seeds of plants which can be obtained according to the inventive method.</p> (57) Zusammenfassung <p>Beschrieben sind Nukleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind sowie die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen. Beschrieben sind weiterhin Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Beschrieben sind ferner Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe integriert werden und die erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden. Darüberhinaus sind Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen beschrieben, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Abscissionszonenbildung

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind, sowie die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen. Die Erfindung betrifft weiterhin Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe integriert wird und die erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden. Darüberhinaus betrifft die Erfindung Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Technischer Hintergrund

Die Leistungseigenschaften von Nutz- und Zierpflanzen werden maßgeblich durch ihre Architektur bestimmt. Während sich der Grundbauplan einer Pflanze in der Embryonalentwicklung manifestiert, ist die postembryonale Phase durch die Aktivität der Apikalmeristeme gekennzeichnet. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Fähigkeit des Sproßapikalmeristems (SAM) höherer Pflanzen, Verzweigungen des Sprosses zu initiieren und deren Entwicklung zu steuern. So wird der Habitus einer Pflanze und damit ein wesentliches Leistungsmerkmal geprägt durch Zahl, Anordnung und Entwicklungsintensität ihrer Seitentriebe. Die Verzweigung des Sprosses kann sowohl terminal als auch lateral erfolgen. Die terminale Verzweigung, bei der sich das SAM in zwei Teile aufspaltet, tritt vor allem bei niederen Kormophyten auf und ist nur für wenige Blütenpflanzen beschrieben worden (Steeves und Sussex, 1989, Patterns in Plant Development, 2. Auflage, Cambridge University Press,

Cambridge). Die für Blütenpflanzen typische laterale Verzweigung beruht auf der Entstehung neuer Sproßapikalmeristeme in den Blattachsen. Diese gehen auf Zellen des SAM zurück, deren meristematischer Charakter im Gegensatz zu den sie umgebenden Zellen, die an der Entwicklung der Blattprimordien beteiligt sind, erhalten bleibt. Im weiteren
5 Entwicklungsverlauf bildet sich aus diesen Restmeristemen eine Seitenknospe, die neben einigen Blattprimordien ein Apikalmeristem enthält, dessen Aktivität jedoch der Kontrolle durch das SAM des Hauptsprosses unterliegt.

Die Analyse von Pflanzenmutanten ergab, daß die Verzweigung des Sproßsystems von
10 genetischen Faktoren gesteuert wird. So ist zum Beispiel bei der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) eine Reihe von Mutanten beschrieben worden, deren Seitentriebbildung auf unterschiedlichen Stadien gehemmt ist (z.B. *blind*, *blind-2*, *torosa*, *lateral suppressor*). Eine morphologische Charakterisierung zeigte, daß bei den Tomatenmutanten *blind*, *blind-2* und *torosa* das Austreiben der Achselknospen gestört ist (Tucker, 1979, Ann. Bot. 43:571-577;
15 Mapelli und Lombardi, 1982, Plant & Cell Physiol. 23:751-757). Dagegen unterbleibt bei Pflanzen, die homozygot für die rezessive *lateral suppressor* (*ls*) Mutation sind, bereits die Anlage der meisten Seitenknospen (Brown, 1955, Rep. Tomato Genetics Cooperative, 5:6-7). Eine histologische Analyse (Malayer und Guard, 1964, Amer. Jour. Bot., 51:140-143) zeigt, daß direkt vom SAM abstammende Zellen in den Achseln der Blattprimordien, auf deren
20 meristematischer Aktivität die Entstehung der Seitenknospen beruht, in der *lateral suppressor*-Mutante fehlen. Würde ein Fehlen von Seitentrieben in allen Blattachsen zu einer Termination der Sproßachse in der ersten Infloreszenz führen, so zeigt sich mit dem Übergang zur floralen Entwicklung, daß die Fähigkeit zur Anlage von Achselmeristemen in der Mutante nicht vollständig verloren gegangen ist. In der Achsel des unmittelbar vor der Infloreszenz
25 angelegten Blattprimordiums wird auch in homozygoten *ls*-Mutanten häufig ein Meristem angelegt. Die Anlage dieses für den sympodialen Aufbau der Sproßachse notwendigen Meristems wird oft von der Entstehung einer Seitenknospe in der Achsel des nächstälteren Blattes begleitet. Nach dem Übergang in die florale Phase ist die Entwicklung der *ls*-Mutante durch eine geringere Anzahl von Blüten pro Infloreszenz (Williams, 1960, Heredity, 14:285-
30 296), die fehlende Anlage von Petalenprimordien (Szymkowiak und Sussex, 1993, Plant J., 4:1-7) und eine aberrante Zahl von Stamina und Karpellen (Groot *et al.*, 1994, Sci. Hort., 59:157-162) gekennzeichnet. Weiterhin wird bei der Mutante eine reduzierte Fertilität beobachtet, was auch eine Reduktion des Ertrages zur Folge hat und der Grund dafür ist, daß die *ls*-Mutante für den Ertragsanbau keine Bedeutung erlangte.

Eine weitere phänotypische Veränderung der *ls*-Mutante betrifft die Ausbildung von Abscissionszonen in den Blüten- und Fruchtsielen. Während Wildtyppflanzen einen Bereich von 5-10 Lagen von kleineren Zellen besitzen, an dessen distalem Ende die nicht befruchtete Blüte bzw. die reife Frucht sich von der Pflanze löst (Roberts et al. 1984, *Planta*, 160: 159-163), wird diese Abscissionszone in der *ls*-Mutante nicht ausgebildet und die Frucht löst sich bei der Ernte ohne Reste des Fruchtsiels und der Kelchblätter von der Pflanze.

Die beobachteten phänotypischen Veränderungen sind auf physiologischer Ebene mit Störungen in den Gleichgewichten bestimmter Pflanzenhormone korreliert. Im Vergleich zum Wildtyp wurden in den Sproßspitzen von *ls*-Mutanten niedrigere Cytokininkonzentrationen gemessen (Maldiney et al., 1986, *Physiol. Plant*, 68:426-430; Sossountzov et al., 1988, *Planta*, 175:291-304), während die Mengen β -Indolylessigsäure (IAA)-ähnlicher Verbindungen sowie Gibberellin- und Abscisinsäure deutlich erhöht sind (Tucker, 1976, *New Phytol.*, 77:561-568). Versuche, die Defekte der *ls*-Mutante durch Einführung eines Isopentenyltransferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* zu beheben, führten zwar zu einer Erhöhung der endogenen Cytokininkonzentrationen, aber nicht zu einer Normalisierung der Seitentriebentwicklung (Groot et al., 1995, *Plant Growth Regulation*, 16:27-36).

Aufgrund des großen Interesses der Züchter an einstämmigen Tomatensorten gab es schon frühzeitig Bestrebungen, die *ls*-Mutante für den gewerblichen Anbau nutzbar zu machen. Da die DNA-Sequenz des für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen Gens (*Ls*-Gen) bisher nicht bekannt war, wurde wiederholt versucht, auf genetischem Wege die erwünschten Effekte auf die Seitentriebbildung von den unerwünschten Effekten auf Fertilität und Ertrag zu trennen. Alle diese Bemühungen führten bis jetzt jedoch nicht zum Erfolg.

Zur Isolierung von Genen, die nur durch einen mutanten Phänotyp und ihre Position auf der genetischen Karte charakterisiert sind, wurden in den letzten Jahren bevorzugt die Strategien der Insertionsmutagenese und der positionellen Klonierung verwendet. Die Insertionsmutagenese nutzt durch Insertion einer bekannten Sequenz erzeugte mutante Allele zur Isolierung der auf diese Weise molekular markierten Gene. Bei Pflanzen wurden sowohl die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al., 1992, *Plant Mol. Biol.*, 20:963-976) als auch transponierbare Elemente (Gierl und Saedler, 1992, *Plant Mol. Biol.*, 19: 39-49) zur Insertionsmutagenese eingesetzt (Jones et al., 1994, *Science* 266:789-793). Da die transponierbaren Elemente *Ac* und *Ds* aus Mais präferentiell an gekoppelte Positionen auf dem

gleichen Chromosom transponieren (Knapp *et al.*, 1994, Mol. Gen. Genet., 243:666-673), ist eine Transposonmutagenese dann besonders aussichtsreich, wenn eine Ausgangslinie zur Verfügung steht, in der das transponierbare Element in enger Kopplung zu dem gesuchten Gen vorliegt. Da eine solche Tomatenlinie nicht zur Verfügung steht, ist eine
5 Transposonmutagenese zur Isolierung des *Ls*-Gens wenig aussichtsreich.

Die Strategie der positionellen Klonierung wurde zur Analyse der molekularen Grundlagen von Erbkrankheiten in Säugetieren entwickelt und u.a. für die Isolierung der menschlichen Gene für Duchenne Muskeldystrophie (Koenig *et al.*, 1987, Cell, 50:509-517), Cystische Fibrose
10 (Rommens *et al.*, 1989, Science, 245:1059-1065) und Chorea-Huntington (Huntington's Disease Research Group, 1993, Cell, 72:971-983) eingesetzt. In Zeichnung 1 ist der Ablauf einer positionellen Klonierung schematisch dargestellt. Von zentraler Bedeutung für diese Strategie ist die Integration des klassischen genetischen Locus in eine Karte molekularer Marker. Der Einsatz von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) als genetische
15 Marker (Botstein *et al.*, 1980, Am. J. Hum. Genet., 32:314-331) ermöglicht die Identifizierung enggekoppelter DNA-Fragmente aus der Umgebung des zu isolierenden Gens. Diese Fragmente dienen anschließend als Hybridisierungs sonden in der Southern-Analyse mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Chu *et al.*, 1986, Science, 234:1582-1585) aufgetrennter hochmolekularer DNA, um den relativen genetischen Abstand in einen absoluten Wert für den
20 physikalischen Abstand zu übersetzen, der durch den sogenannten "chromosome walk" zu überbrücken ist. Ausgehend von den flankierenden Markern als Startpunkte wird die Umgebung des gesuchten Gens in Form überlappender DNA-Fragmente isoliert. Je nach Distanz der flankierenden Marker in der genetischen Karte handelt es sich bei den DNA-Fragmenten um YAC- oder Cosmid-Klone (Burke *et al.*, 1987, Science, 236:806-812). RFLP-
25 Karten hoher Markerdichte sind von Nam *et al.*, 1989, Plant Cell, 1:699-705, und Tanksley *et al.*, 1992, Genetics, 132:1141-1160, entwickelt worden. Grill und Somerville, 1991, Mol. Gen. Genet., 226:484-490, und Martin *et al.*, 1992, Mol. Gen. Genet., 233:25-32, beschreiben die Erstellung von YAC-Bibliotheken.

30 In der klassischen genetischen Karte der Tomate kartiert der *Ls*-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 7 (Taylor und Rossall, 1982, Planta, 154:1-5). Schumacher *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet., 246:761-766, beschreiben eine Integration des *Ls*-Locus in die RFLP-Karte wobei der *Ls*-Locus in einem 0,8 cM-Intervall nahe dem distalen Ende von Chromosom 7 kartiert wurde. Weiterhin beschreiben Schumacher *et al.*, daß der *Ls*-Locus durch die RFLP-
35 Marker CD61 und CD65 begrenzt wird. Die physikalische Kartierung mittels

Pulsfeldgelelektrophorese zeigte, daß CD61 und CD65 nicht mehr als 375 kb voneinander entfernt liegen.

Bei vielen Nutzpflanzen ist die Bildung von Seitentrieben vom Standpunkt der landwirtschaftlichen Nutzung her aus verschiedenen Gründen unerwünscht:

1. Die jungen Seitentriebe sind zunächst "Sink"-Organe (Verbraucher-Organe) und reduzieren daher den Ertrag am Hauptsproß.
2. Stark verzweigte Sproßsysteme stellen für eine mechanische Bearbeitung (z.B. maschinelle Ernte) oft ein kaum überwindliches Hindernis dar.

Aus diesen Gründen ist schon frühzeitig versucht worden, seitentriebsfreie Sorten auf konventionellem Wege zu züchten. Bei einzelnen Nutzpflanzen (z.B. Sonnenblume) ist dies gelungen. Dagegen ist bei vielen anderen dikotylen Nutzpflanzen (z.B. Tomate, Gurke, Apfelbaum, Birnbaum) die Einstämmigkeit zwar wünschenswert, konnte aber bisher nicht in leistungsfähigen Zuchtsorten realisiert werden. Auch bei monokotylen Nutzpflanzen wie Mais und Zuckerrohr ist die Unterdrückung der Seitentriebbildung von Vorteil und für die gewerbliche Nutzung sehr erwünscht. Zur Zeit wird bei dem in Mittel- und Nordeuropa üblichen Gewächshausanbau z.B. der Tomate die Einstämmigkeit dadurch erreicht, daß die Seitentriebe manuell entfernt werden. Da das Entfernen der Seitentriebe nicht maschinell ausgeführt werden kann, ist dies mit einem hohen Kostenaufwand verbunden. Außerdem sind die Pflanzen an den Wundstellen für Infektionen durch Pathogene wie pathogene Bakterien, Viren und Pilze sehr empfänglich, weshalb die Entfernung der Seitentriebe häufig zu einer Ausbreitung von Krankheiten im Gewächshaus beiträgt.

Dagegen ist bei vielen Zierpflanzen die zusätzliche Ausbildung von Seitentrieben und als Folge davon eine vermehrte Blütenbildung erwünscht. Die vermehrte Seitentriebbildung ist ebenfalls bei verschiedenen Nutzpflanzen wie Kartoffeln, dem Kaffee- oder Teestrauch von hohem Nutzen. Es besteht somit ein Bedarf an kostengünstigen, leistungsfähigen Nutzpflanzen und Zierpflanzen, in denen die Seitentriebbildung verstärkt oder unterdrückt ist.

Eine Inhibition der Ausbildung von Abscissionszonen ist in einer Reihe von Pflanzen von Interesse. So führt der vorzeitige Abwurf von Früchten bei Zitruspflanzen zu Ertragsverlusten, die sich verhindern ließen, wenn keine Abscissionszonen ausgebildet würden. Ähnliches findet sich auch bei anderen Obstsorten wie Kirschen, Pfirsichen oder Johannisbeeren. Ferner ist eine

Inhibition der Ausbildung von Abscissionszonen z.B. in der Tomatenpflanze von Vorteil. Werden die Abscissionszonen nicht ausgebildet, löst sich die Frucht bei der Ernte ohne Reste des Fruchtsiels und der Kelchblätter von der Pflanze. Diese Eigenschaft ist erwünscht, wenn die Tomaten maschinell geerntet und anschließend zu Produkten wie Tomatenmark verarbeitet werden, da die Kelchblätter und Fruchtsiele die Qualität der Tomatenprodukte verschlechtern.

Eine verstärkte Ausbildung von Abscissionszonen kann bei Zierpflanzen dazu genutzt werden, daß die Blüten nach dem Abblühen von selbst abfallen und nicht wie bei vielen Balkon- und Gartenpflanzen manuell entfernt werden müssen. Falls dies unterbleibt, wird oft die Bildung neuer Blüten unterdrückt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Isolierung und Klonierung des *Ls*-Gens würde die Möglichkeit eröffnen, die Aktivität dieses Gens gezielt zu verändern und damit in transgenen Pflanzen die Anlage von Seitentrieben entweder zu unterdrücken oder zu verstärken. Ferner wird die Möglichkeit eröffnet, durch gezielte Veränderung der Aktivität des *Ls*-Gens die Bildung von Abscissionszonen und/oder Petalen zu unterdrücken oder zu verstärken. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, das *Ls*-Gen oder ein DNA-Fragment, das dieses Gen enthält, zu isolieren, seine Sequenz zu bestimmen und ein Verfahren zur Erzeugung von transgenen Pflanzen bereitzustellen, in denen die Aktivität des *Ls*-Gens gezielt verändert wurde, um die Anlage von Seitentrieben und/oder die Bildung von Abscissionszonen und/oder Petalen entweder zu unterbinden oder zu verstärken.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch die Bereitstellung von Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 und von Nukleotidsequenzen, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 hybridisieren, gelöst, wobei die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 und die Nukleotidsequenzen, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 hybridisieren, Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind. Der Ausdruck "Hybridisierung" bezieht sich erfindungsgemäß auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, bevorzugt bezieht sich "Hybridisierung" auf solche Hybridisierungsbedingungen, bei denen der T_M -Wert im Bereich von T_M -Wert 45°C bis T_M -Wert 68°C liegt. Besonders bevorzugt bezieht sich der Begriff "Hybridisierung" auf stringente

Hybridisierungsbedingungen. Ferner betrifft die Erfindung die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung gelöst, wobei die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengeweben integriert wird und die erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden.

In der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bevorzugt, bei dem die integrierte DNA die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung unterdrückt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die integrierte DNA in Antisense-Orientierung zur komplementären, die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung steuernden, endogenen Sequenz exprimiert wird. Ebenfalls besonders bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die integrierte DNA in Sense-Orientierung zur komplementären, die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung steuernden, endogenen Sequenz exprimiert wird. Weiterhin besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung durch ein Ribozym, umfassend die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder deren Fragment oder Derivat, unterdrückt wird. Weiterhin besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder deren Fragment oder Derivat eingesetzt wird, um das endogene Gen in Pflanzen durch homologe Rekombination auszuschalten ("knock-out").

In der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren bevorzugt, bei dem die ins Genom der Pflanzen integrierte DNA die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verstärkt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäße DNA in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

Insbesondere bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von transgenen Tomaten-, Raps-, Kartoffel- oder Löwenmaulpflanzen. Insbesondere bevorzugt ist auch ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, wobei die ins Genom

der Pflanzen integrierte DNA die Sequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 oder deren Fragment oder Derivat umfaßt, oder komplementär zu dieser Sequenz oder deren Fragment oder Derivat ist, oder mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 oder deren Fragment oder Derivat hybridisiert und ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung codiert.

Die Erfindung betrifft weiterhin transformierte Pflanzenzellen oder transformiertes Pflanzengewebe, bei dem eine für die Kontrolle der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Die Erfindung betrifft ferner Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Zeichnungen erläutert.

In Zeichnung 1 ist der Ablauf einer positionellen Klonierung schematisch dargestellt.

In Zeichnung 2 ist (a) ein Ausschnitt aus der von Tanksley *et al.*, 1992, Genetics, 132:1141-1160 veröffentlichten RFLP-Karte dargestellt. In (b) ist die *Ls*-Region nach Schumacher *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet., 246:761-766, in diese Karte integriert.

Zeichnung 3 zeigt die Kartierung von cDNA- und Cosmid-Klonen aus der *Ls*-Region. Die Cosmid-Klone A, B, C, D, E, F, G und L sowie der YAC-Klon CD61-5 sind durch Balken symbolisiert. Die Positionen der cDNA-Klone c10, c21, y25 und ET sind durch offene Rechtecke dargestellt. Die gestrichelten Linien symbolisieren Rekombinationspunkte in den F₂-Pflanzen 23, 24, 865 und 945.

Zeichnung 4 zeigt die Autoradiographie einer Southern-Blot-Analyse zum Nachweis von *Ls*-verwandten Genen in verschiedenen Pflanzenarten. Genomische DNA aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Löwenmaul (*A. majus*) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt und mit dem cDNA-Klon ET hybridisiert.

In Zeichnung 5 ist die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des Wildtyp *Ls*-Gens aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

aufgeführt.

In Zeichnung 6 ist die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) des *Ls*-homologen Gens aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*) aufgeführt.

In Zeichnung 7 ist die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Ein-Buchstaben-Code) eines 687 bp langen DNA-Fragments des *Ls*-homologen Gens aus *Arabidopsis thaliana* aufgeführt.

Zeichnung 8 zeigt eine Aminosäuresequenz-Gegenüberstellung (engl.: *alignment*) der *Ls*-Polypeptide aus *Arabidopsis thaliana* (LsAt), *Lycopersicon esculentum* (LsLe) und *Solanum tuberosum* (LsSt). Für die Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren sind mit einer grauen Schattierung unterlegt. Ein Strich (-) bedeutet fehlende Sequenzinformation, ein Punkt (.) bedeutet eine zusätzliche Aminosäure in einem Polypeptid. Ein Stern (*) bedeutet ein Stopcodon auf Nucleinsäureebene.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Methode der Klonierung mehrerer hundert Kilobasen großer DNA-Fragmente als künstliche Hefe-Chromosomen (Yeast Artificial Chromosome: YAC) in *Saccharomyces cerevisiae* (Burke *et al.*, 1987, Science, 236:806-812) erlaubt die Umsetzung der physikalischen Karte in eine Reihe überlappender YAC-Klone, die das zu isolierende Gen überspannen. Aus einer YAC-Bibliothek der Tomate (Martin *et al.*, 1992, Mol. Gen. Genet., 233:25-32) wurden Klone isoliert, die den RFLP-Marker CD61 enthielten. Durch Kartierung der YAC-Endfragmente relativ zu den das *Ls*-Gen flankierenden RFLP-Markern sowie zu den Rekombinationsbruchpunkten und zum *Ls*-Gen selbst wurde die Lage der isolierten DNA-Fragmente in der *Ls*-Region bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß der YAC-Klon CD61-5 sowohl mit CD61 als auch mit CD65 hybridisierte und somit den gesamten genomischen Abschnitt einschließlich des *Ls*-Gens enthält. In Zeichnung 3 ist die Lage der Marker und des YAC-Klons schematisch dargestellt.

Zur Identifizierung von innerhalb dieses YAC-Klons gelegenen kodierenden Regionen wurde dieser Klon als radioaktiv markierte Sonde zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek (Simon, 1990, Dissertation, Universität zu Köln, Köln, FRG) eingesetzt. Die verwendete

cDNA-Bibliothek ist aus RNA sowohl aus vegetativen als auch aus floralen Sproßspitzen hergestellt worden und repräsentiert somit die exprimierten Gene der Gewebe, in denen sich der Phänotyp der *Ls*-Mutation manifestiert. Eine Charakterisierung der cDNA-Klone durch kreuzweises Hybridisieren ergab, daß die gereinigten Klone insgesamt 29 verschiedene Transkripte repräsentierten. Bei der anschließenden Feinkartierung der cDNA-Klone relativ zu den Rekombinationsbruchpunkten im Intervall CD61-CD65 stellte sich heraus, daß nur der cDNA-Klon y25 mit dem *Ls*-Gen kosegregierte und als Kandidat für dieses Gen in Frage kam. Im Anschluß an die Etablierung eines Cosmid-"Contigs" wurden auch Cosmid-Klone als Sonden eingesetzt, um weitere cDNA-Klone aus dem CD61-CD65-Intervall zu isolieren, die beim Durchmustern mit dem YAC-Klon CD61-5 als Sonde aufgrund der hohen Komplexität der Sonde nicht nachweisbar waren. In diesen Experimenten wurden drei weitere cDNA-Klone (c10, c21 und ET) isoliert, die ebenfalls mit dem *Ls*-Gen kosegregierten und als weitere Kandidaten für das *Ls*-Gen in Frage kamen. Es wurden somit insgesamt vier cDNA-Klone aus der *Ls*-Region identifiziert, die Kandidaten für das *Ls*-Gen waren. Die Klone sind in Zeichnung 3 durch offene Rechtecke dargestellt.

Um das *Ls*-Gen zusammen mit den für die Steuerung der Expression notwendigen Promotorsequenzen zu klonieren, wurde der cDNA-Klon y25 als Ausgangspunkt für die Isolierung von kürzeren genomischen DNA-Fragmenten aus der *Ls*-Region benutzt. Zu diesem Zweck wurde eine genomische Cosmid-Bibliothek der Tomate in dem Vektor pCLD04541 (Bent *et al.*, 1994, Science, 265:1856-1860) etabliert. Dieser Vektor enthält die zur Pflanzentransformation notwendigen T-DNA-"border"-Sequenzen und erlaubt daher eine Einführung der isolierten DNA-Fragmente in Pflanzenzellen ohne weitere Klonierungsschritte. Aus dieser Bibliothek wurde in mehreren üblichen Klonierungsschritten eine Reihe von überlappenden Cosmid-Klonen isoliert. Die Kartierung dieser Cosmid-Klone relativ zu den Rekombinationsbruchpunkten im untersuchten Intervall zeigte, daß die isolierten genomischen DNA-Fragmente zusammen einen genomischen Abschnitt von ca. 60 kb überspannen. Die Lage der Cosmid-Klone ist in Zeichnung 3 schematisch dargestellt.

Zur Untersuchung der Frage, ob ein Gen aus dem als Cosmid-"Contig" isolierten genomischen DNA-Abschnitt die in der *Ls*-Mutante fehlende biologische Funktion zur Anlage von Seitentrieben, Petalen und Abscissionszonen ersetzen kann (Komplementationsexperiment), wurde die *Ls*-Mutante mit den Cosmid-Klonen A, B, C, D, E, F, G und L transformiert. Bei allen Transgenen, die durch Einführung der Cosmide A, B, C, D, E und F hergestellt wurden, konnte keine Veränderung des Phänotyps beobachtet werden. Dagegen war bei acht

unabhängigen transgenen Pflanzen, die entweder das Cosmid G oder L enthielten, eine partielle oder vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps, zu beobachten. Die Ergebnisse der Komplementationsexperimente sind in Tabelle I aufgeführt.

Cosmid	Zahl der transformierten Pflanzen	Zahl der komplementierten Pflanzen
pCLDO4541	8	0
A	5	0
B	15	0
C	5	0
D	7	0
E	2	0
F	8	0
G	5	3
L	11	5

Tabelle 1: Versuche zur Komplementation der *ls*-Mutante durch Cosmid-Transformation

Diese transgenen Pflanzen bilden während der vegetativen Entwicklung Seitentriebe und in der Blütenentwicklung wieder Petalen und Abscissionszonen. Eine Southern-Blot-Analyse der transgenen Cosmid G oder Cosmid L enthaltenden Pflanzen ergab, daß bei Pflanzen, die keine Komplementation zeigten, die T-DNA nur unvollständig übertragen worden war. Somit ist gezeigt worden, daß die eingeführten DNA-Fragmente die in der Mutante nicht vorhandene genetische Information zur Anlage von Seitentrieben, Petalen und Abscissionszonen komplementieren können.

Aufgrund von Komplementationsexperimenten mit Subfragmenten des Cosmids G ließ sich der DNA-Abschnitt, in dem das *Ls*-Gen liegt, genauer bestimmen. Während nach Transformation mit DNA-Fragmenten, die das zuvor identifizierte Gen c21 enthielten, keine Komplementation des *ls*-Phänotyps beobachtet wurde, konnte durch Einführung eines ca. 6 Kb-Fragments, das das Gen ET trägt, in acht unabhängigen transgenen Pflanzen der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden. Eine DNA-Sequenzanalyse ergab, daß das ET-Gen der *ls'*-Mutante eine Deletion von 1550 Bp trägt, die die ersten 185 Aminosäuren des Proteins und 865 Bp der

davor gelegenen Sequenz entfernt. Ein zweites unabhängiges mutantes Allel, *ls*², enthält ein 3 Bp-Insertion und mehrere Punktmutationen in einem kurzen DNA-Abschnitt, von denen eine zu einem Abbruch des Proteins nach 24 Aminosäuren führt. Aus den Komplementationsexperimenten und der Isolierung und Kartierung der cDNAs, sowie den Sequenzanalysen des Gens ET aus dem Wildtyp und zwei unabhängigen *ls*-Allelen ergab sich, daß der cDNA-Klon ET die gesamte codierende Sequenz der mRNA des *Ls*-Gens repräsentiert.

Zur Untersuchung der Frage, ob ähnliche oder homologe Gene auch in anderen Pflanzenarten vorkommen, wurde der cDNA-Klon ET als Hybridisierungs-sonde in Southern-Experimenten unter reduzierter Stringenz eingesetzt. Der Ausdruck "Pflanze" umfaßt, wie er hier verwendet wird, monokotyle und dikotyle Nutz- und Zierpflanzen. Der Begriff der "reduzierten Stringenz" betrifft hier übliche Hybridisierungsbedingungen mit der Abweichung, daß die Hybridisierungstemperatur zwischen 50°C und 55°C lag. In Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Löwenmaul (*Antirrhinum majus*) konnten mehrere DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Aus Löwenmaul wurden durch Hybridisierung bei 55°C mehrere genomische Klone isoliert. Eine DNA-Sequenzanalyse ergab, daß der isolierte Löwenmaul-Klon signifikante Sequenzhomologien zum *Ls*-Gen besitzt. Homologe Gene zum *Ls*-Gen der Tomate können demnach unter Verwendung des cDNA-Klons ET als Sonde nach üblichen Verfahren isoliert werden. Mit genspezifischen Primern wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) das *Ls*-homologe Gen isoliert. Das *Ls*-homologe Gen der Kartoffel zeigt zum *Ls*-Gen der Tomate sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine Sequenzidentität von etwa 98 %. Mit degenerierten Primern wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ein 687 bp DNA-Fragment des *Ls*-homologen Gens isoliert. Auf DNA-Ebene zeigt das *Arabidopsis thaliana*-DNA-Fragment zum *Ls*-Gen der Tomate eine Sequenzidentität von etwa 63 %. Auf Protein-Ebene sind etwa 55 % der Aminosäuren identisch.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen, die aus einem pflanzlichen Genom stammen und ein Protein kodieren, das zur Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Bildung von Petalen und/oder Bildung von Abscissionszonen notwendig ist. Die in der Nukleotidsequenz enthaltene Information führt bei Einführung und Expression in pflanzlichen Zellen zur Bildung einer Ribonukleinsäure. Über diese Ribonukleinsäure kann eine Proteinaktivität in die Zellen eingeführt oder eine endogene Proteinaktivität unterdrückt werden. Besonders bevorzugt ist eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 aus *Lycopersicon*

esculentum, die in Zeichnung 5 dargestellt ist, eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO:9 aus *Solanum tuberosum*, die in Zeichnung 6 dargestellt ist und eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO:13 aus *Arabidopsis thaliana*, die in Zeichnung 7 dargestellt ist.

5 Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Fragmente oder Derivate, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, zur Transformation von Pflanzenzellen. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können unter Verwendung verschiedener Verfahren eingesetzt werden, um die Bildung von Seitentrieben und somit
10 Verzweigungen des Sproßsystems und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen zu unterdrücken:

1. Um die Bildung von Seitentrieben und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen zu unterdrücken, kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz in Antisense (Gegensinn)- oder
15 Sense (Sinn)-Orientierung in übliche Vektoren (z.B. Plasmide) kloniert werden und dabei mit Steuerelementen für die Expression in pflanzlichen Zellen, wie Promotoren und Terminatoren, kombiniert werden. Mit den hergestellten Vektoren können pflanzliche Zellen transformiert werden mit dem Ziel, die Synthese des endogenen Proteins zu verhindern. Zu diesem Zweck können auch kürzere Teile der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, also Fragmente, oder DNA-
20 Sequenzen mit Sequenzähnlichkeit von 50% bis 100%, also Derivate, verwendet werden. So kann das aus *Arabidopsis* isolierte *Ls*-homologe Gen z.B. zur Unterdrückung der Bildung von Seitentrieben und somit Verzweigungen des Sproßsystems und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen in der verwandten Art *Brassica napus* (Raps) eingesetzt werden. Die gezielte Unterdrückung einer Genaktivität in pflanzlichen Zellen durch Einführung von
25 Antisense- oder Sense-Konstrukten ist ein übliches Verfahren, das in vielen Fällen erfolgreich eingesetzt worden ist (Gray *et al.*, 1992, Plant. Mol. Biol., 19:69-87).

2. Weiterhin kann die Bildung von Seitentrieben und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen durch Expression eines für diesen Zweck konstruierten Ribozyms unter Verwendung der
30 erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen inhibiert werden. Die Herstellung und Verwendung von Ribozymen wird in de Feyter *et al.*, 1996, Mol. Gen. Genet., 250:329-338 für Tabakmosaikvirus-resistente Tomaten- und Tabakpflanzen beschrieben.

3. Außerdem kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz verwendet werden, um das endogene
35 Gen zu inaktivieren. Anhand der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können Oligonukleotide

synthetisiert werden, um Pflanzen im Rahmen von Mutageneseexperimenten mit Hilfe der PCR-Technik auf die Anwesenheit von Insertionen (z.B. transponierbare Elemente oder die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*) im *Ls*-Gen zu testen. Durch solche Insertionen wird die Genaktivität in der Regel blockiert (Koes *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8149-8153).

4. Ebenfalls kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eingesetzt werden, um das endogene *Ls*-Gen durch homologe Rekombination auszuschalten ("knock-out"). Dieses Verfahren wurde bei Mäusen erfolgreich eingesetzt und ist auch für die Anwendung in Pflanzen von Miao und Lam, 1995, Plant. J., 7:359-365 beschrieben worden.

Im Gegensatz zur Tomate und anderen Nutzpflanzen werden bei Zierpflanzen (z.B. Geranien, Fuchsien, Chrysanthemen) häufig Phänotypen bevorzugt, die aufgrund einer starken Entwicklung der Seitentriebe einen buschigen Wuchs zeigen. Um diese Wuchsformen zu erzeugen, werden die Pflanzen heute entweder dekapitiert, was das Austreiben der Seitenachsen fördert, oder mit bestimmten Chemikalien behandelt. Auch diese Praxis ist mit einem beträchtlichen finanziellen Aufwand verbunden. Die erfindungsgemäße Herstellung von transgenen Pflanzen mit buschigen Wuchsformen stellt in diesen Fällen eine kostengünstigere Alternative dar.

Eine verstärkte Ausbildung von Abscissionszonen kann bei Zierpflanzen dazu genutzt werden, daß die Blüten nach dem Abblühen von selbst abfallen und nicht wie bei vielen Balkon- und Gartenpflanzen manuell entfernt werden müssen. Falls dies unterbleibt, wird oft die Bildung neuer Blüten unterdrückt.

Zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit starker Seitentriebentwicklung und/oder Abscissionszonenbildung wird die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat, das durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet ist, in Sense-Orientierung in Plasmide eingebracht und mit Steuerelementen für die Expression in pflanzlichen Zellen kombiniert. Mit diesen Plasmiden können pflanzliche Zellen transformiert werden, mit dem Ziel der Expression einer translatierbaren Botenribonukleinsäure (mRNA), die die Synthese eines Proteins erlaubt, welches die Bildung und Entwicklung von Seitentrieben und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen stimuliert.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder Fragmente oder Derivate, die durch Insertion,

Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet sind, können dazu genutzt werden, aus dem Genom der Tomate oder anderer Pflanzen homologe oder ähnliche DNA-Sequenzen zu isolieren, die ebenfalls die Bildung von Seitentrieben und/oder Petalen und/oder Abscissionszonen beeinflussen. Zu diesem Zweck können die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder Fragmente, z.B. Oligonukleotide, oder Derivate als Sondenmoleküle (engl.: *probe*) eingesetzt werden, um nach üblichen Verfahren cDNA-Bibliotheken oder genomische DNA-Bibliotheken der zu durchmusternden Pflanzen abzusuchen. Alternativ dazu können von der erfindungsgemäßen Sequenz degenerierte oder nicht degenerierte Oligonukleotide (Primer) abgeleitet werden, die zur Durchmusterung dieser cDNA-Bibliotheken oder genomischen DNA-Bibliotheken auf PCR-Basis benutzt werden können. Die so isolierten verwandten DNA-Sequenzen können ebenso wie die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen zur Inhibition oder Stimulation der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung bei Pflanzen eingesetzt werden.

Zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Sense- oder Antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen sind einerseits Transkriptionspromotoren und andererseits Transkriptionsterminatoren notwendig. Promotoren und Terminatoren sind in großer Zahl in der Literatur beschrieben (z.B. Köster-Töpfer *et al.*, 1989, Mol. Gen. Genet., 219:390-6; Rocha-Sosa *et al.*, 1989, EMBO J., 8:23-29). Die transkriptionellen Start- und Terminationsbereiche können entweder aus der Wirtspflanze oder aus einem heterologen Organismus stammen. Die DNA-Sequenzen der Transkriptionsstart- und Transkriptionsterminationsregionen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten.

Verfahren zur genetischen Modifikation sind sowohl für dikotyle als auch für monokotyle Pflanzen beschrieben worden (Gasser und Fraley, 1989, Science, 244:1293-1299; Potrykus, 1991, Ann. Rev. Plant. Mol. Biol. Plant. Physiol., 42:205-226). Neben der Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Hoekema, 1983, Nature, 303:179-180; Filatti *et al.*, 1987, Biotech., 5:726-730) kann DNA durch Transformation von Protoplasten, Mikroinjektion, Elektroporation oder ballistische Methoden in Pflanzenzellen eingeführt werden. Zur Selektion von transformierten Pflanzenzellen wird die einzuführende DNA mit einem Selektionsmarker gekoppelt, der den Zellen eine Resistenz gegenüber Antibiotika (z.B. Kanamycin, Hygromycin, Bleomycin) verleiht. Aus den transformierten Pflanzenzellen können dann in einem üblichen Selektionsmedium ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regenerierung von Pflanzenzellen ist beschrieben, z.B. in der EP-B-0 242 236, auf die hier

speziell Bezug genommen wird. Die so erhaltenen Pflanzen werden mit üblichen molekularbiologischen Methoden auf Anwesenheit und Intaktheit der eingeführten DNA getestet. Ist die eingeführte DNA einmal im Genom integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und wird an die Nachkommen vererbt. Von den so erhaltenen Pflanzen kann dann mit den üblichen Verfahren Saatgut erhalten werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Die Beispiele sind nicht einschränkend aufzufassen. Wenn nicht anders angegeben wurden molekularbiologische Standardmethoden benutzt, wie von Sambrook *et al.*, 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York beschrieben. Southern-Hybridisierungen wurden in 6 x SSPE (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 5 mM EDTA, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP, 0,5% SDS, 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA) mit einer Hybond N⁺ Membran (Amersham) durchgeführt. Plaque-Hybridisierungen wurden in 6 x SSPE (1,08 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 6 mM EDTA, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP, 0,1% SDS, 200 µg/ml Kalbsthymus-DNA) mit einer Hybond N⁺ Membran (Amersham) durchgeführt.

Beispiel 1

Isolierung von YAC-Klonen aus *Ls*-Region der Tomate

Aus einer YAC-Bibliothek der Tomate (Martin *et al.*, 1992, Mol. Gen. Genet., 233:25-32) wurden Klone isoliert, die den Marker CD61 (Schumacher *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet., 246:761-766) enthielten. Hierzu wurden zunächst DNA-Gemische, die von jeweils einer Mikrotiterplatte mit 96 YAC-Klonen stammten, mittels des üblichen PCR-Verfahrens untersucht. So konnten unter 144 solcher DNA-Gemische neun identifiziert werden, die mit den Primern CD61-F und CD61-R (Schumacher *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet., 246:761-766) ein PCR-Produkt ergaben. Die Isolierung der Einzelklone erfolgte mittels Koloniehybridisierung bzw. mittels einer PCR, bei der die DNA der Klone einer Reihe bzw. Spalte einer Mikrotiter-Platte als Gemisch eingesetzt wurde. Einzelklone wurden so unter 96 Klonen einer Platte mittels 20 PCR-Reaktionen identifiziert. Es wurden insgesamt fünf YAC-Klone identifiziert, deren Insertgröße mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Chu *et al.*, 1986, Science, 234:1582-1585) zu 280-320kb bestimmt wurde. In PCR und Southern-Experimenten wurde gezeigt, daß der YAC CD61-5 neben CD61 auch den zweiten flankierenden Marker CD65 trug und somit den *Ls*-Locus überspannte.

Beispiel 2

Isolierung von cDNA-Klonen der *Ls*-Region der Tomate

Für die Herstellung einer Hybridisierungssonde wurde DNA des YAC-Klons CD61-5 nach Auftrennung mittels Pulsfeldgelelektrophorese isoliert. Die Auftrennung auf diesem Pulsfeldgel erlaubte jedoch nur eine relativ grobe Präparation, so daß die eingesetzte Sonde neben dem YAC-Klon CD61-5 auch Anteile von DNA der Hefe-Chromosomen III (360kb) und VI (280kb) enthielt. Nach radioaktiver Markierung wurde diese DNA als Sonde für das Screening von 5×10^5 pfu (plaque forming units) in einer konventionellen Plaquehybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung mit der YAC-Sonde lieferte eine Vielzahl von Signalen unterschiedlicher Intensität. Für das Rescreening wurden 50 Plaques verschiedener Signalstärken ausgewählt und 44 aufgereinigte Klone konnten anschließend mittels kreuzweiser Hybridisierung gruppiert werden. 23 der 44 aus dem Rescreening hervorgegangenen Klone waren nur einmal vertreten. Insgesamt wurden bei diesem Screening 29 verschiedene Transkripte identifiziert. Nach der Etablierung eines Cosmid-"Contigs" wurde die cDNA-Bibliothek nochmals mit den Cosmid-Klonen als Sonden durchmustert, um weitere cDNA-Klone zu isolieren, die beim Screening mit dem YAC61-5 als Sonde aufgrund der hohen Komplexität der Sonde nicht nachweisbar waren. In diesen Experimenten wurden drei weitere cDNA-Klone isoliert. Insgesamt wurden somit 32 verschiedene Transkripte nachgewiesen.

Beispiel 3

RFLP-Kartierung der isolierten cDNA-Klone der Tomate

Von den 30 identifizierten Transkripten zeigten 22 für "single"- oder "low-copy"- Sequenzen typische Hybridisierungsmuster, die eine RFLP-Kartierung erlaubten. In einer ersten RFLP-Analyse wurden die isolierten cDNA-Klone gegen Filter hybridisiert, die mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und XbaI verdaute DNA aus *L. esculentum*, *L. pennellii* sowie aus der Rückkreuzungslinie IL83 (Eshed *et al.*, 1992, Theor. Appl. Genet., 83:1027-1034) trugen. Diese Linie, bei der das distale Ende von Chromosom 7 aus *L. pennellii* stammt, während der Rest des Genoms aus *L. esculentum*-Chromosomen besteht, erlaubt bei Vorliegen eines Polymorphismus zwischen *L. esculentum* und *L. pennellii* eine erste Grobkartierung. Stammt ein polymorphes DNA-Fragment aus der *Ls*-Region, so zeigte die Linie IL83 das *L. pennellii*-Allel, während für Fragmente aus dem Rest des Genoms das *L. esculentum*-Allel auftrat. Auf diese Weise wurden vier cDNA-Klone identifiziert, die nicht von Chromosom 7 stammen. Die Feinkartierung der 18 verbleibenden cDNA-Klone, die von Chromosom 7

stammen, erfolgte über die RFLP-Analyse der Pflanzen W23 und W24, welche Rekombinationsereignisse im Intervall CD61-*Ls* bzw. *Ls*-CD65 trugen. Da Kandidaten für das *Ls*-Gen in dieser Analyse in Pflanze W23 sowohl das *L. esculentum*- als auch das *L. pennellii*-spezifische Fragment zeigten, während in Pflanze W24 nur das *L. esculentum*-spezifische Fragment auftrat, wurden die cDNA-Klone gegen Filter hybridisiert, die mit EcoRI, EcoRV oder XbaI gespaltene genomische DNA der beiden Elternspezies sowie der beiden Rekombinanten W23 und W24 trugen. Auf diese Weise wurden insgesamt vier cDNA-Klone identifiziert, die mit dem *Ls*-Gen kosegregierten, und somit als Kandidaten für das *Ls*-Gen in Frage kamen.

Beispiel 4

Erstellung und Durchmusterung einer genomischen Cosmidbank der Tomate

DNA des T-DNA/Cosmidvektors pCLD04541 (Bent *et al.*, 1994, Science, 265:1856-1860) wurde nach dem Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, isoliert, über zwei CsCl-Gradienten gereinigt und über 3 Tage gegen TE dialysiert. Die DNA wurde mit BamHI vollständig gespalten und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Autoligation des Vektors zu verhindern. 200ng genomische MboI-partialverdaute Tomaten-DNA und 2mg Vektor-DNA wurden mit T4-DNA-Ligase in 10ml ÜN bei 16°C ligiert. 3ml des Ligationsansatzes wurden zur Verpackung eingesetzt und in *E.coli* SURE (Stratagene) transfiziert. Der Ansatz ergab 6×10^6 unabhängige rekombinante Bakterien. Es wurden 100 Platten mit jeweils 2500 cfu (colony forming units) plattiert und mit jeweils 10ml LB-Medium abgeschwemmt. Aus diesem Material wurde jeweils eine Glycerinkultur angelegt und eine DNA-Präparation durchgeführt. Diese 100 DNA-Pools wurden mittels einer PCR-Analyse durchmustert. Positive Pools wurden dann einer Koloniefilterhybridisierung zur Identifizierung der positiven Einzelklone unterzogen.

Beispiel 5

Klonierung und Sequenzierung des *Ls*-Gens der Tomate

Das Insert des cDNA-Klons ET, der bei der Durchmusterung der cDNA-Bank mit Cosmid G als Sonde isoliert wurde, wurde mit EcoRI ausgeschnitten und in den Vektor pGEM-11Zf(+) kloniert. Das fehlende 5'-Ende des Gens wurde mit Hilfe der RACE-Technik (Frohman *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002) isoliert. Hierbei wurde ausgehend von einem

Oligonukleotid, das spezifisch an schon bekannte Bereiche des Gens bindet, eine komplementäre DNA (cDNA) zur RNA hergestellt. Anschließend wurden mit Terminaler Transferase Desoxycytosinnukleotide an die cDNA angehängt. Mit einem zweiten genspezifischen Primer und einem Primer der an den Polydesoxycytosinschwanz bindet, wurde das 5'-Ende der cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Plasmidvektor pGEM-T kloniert. Anschließend wurden die längsten dieser RACE-Klone sequenziert. Parallel zur Analyse des cDNA-Klons ET wurden Subfragmente des entsprechenden genomischen Bereichs des Cosmids G isoliert und in die Plasmidvektoren pGEM-4Z bzw. pSPORTI umkloniert. Überlappende Subfragmente wurden anschließend sequenziert. Die genomische Sequenz zeigte keine Abweichung zur Sequenz des cDNA-Klons, was bedeutet, daß das *Ls*-Gen kein Intron besitzt. Desweiteren wurden die entsprechenden Genomabschnitte der beiden Mutanten *ls*¹ und *ls*² mittels PCR mit geeigneten Primern aus den genomischen DNAs amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Die Sequenzanalyse dieser Produkte zeigte beim *ls*¹-Allel eine Deletion von 1,5 Kb im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Neben dem Verlust der Nukleotide 1-685 des offenen Leserasters fehlen der *ls*¹-Mutante demnach auch 865 Basenpaare der 5' vom offenen Leseraster gelegenen Region, die wahrscheinlich eine regulatorische Funktion (Promotor) für die Expression besitzt. Es ist daher anzunehmen, daß die *ls*¹-Mutante kein funktionsfähiges Protein des *Ls*-Gens mehr bilden kann. Im *ls*²-Allel wurde eine Insertion von 3 Basenpaaren sowie 3 Basenaustausche im 5'-Bereich des offenen Leserasters gefunden. Einer der Basenaustausche führt zu einem Stopcodon, das einen Abbruch der Aminosäurekette nach 24 Aminosäuren zur Folge hat. Auch hier muß von einem funktionslosen Protein ausgegangen werden. Die Vektoren pGEM-11Zf(+), pGEM-4Z, pGEM-T wurden von der Fa. Promega Corp., Madison, USA, der Vektor pSPORTI von der Fa. Life Technologies, Eggenstein, bezogen und nach Angaben der Hersteller verwendet.

Beispiel 6

Transformation von Pflanzen mit *Ls*-cDNA-Konstrukten der Tomate

Die *Ls*-cDNA wurde mit den genspezifischen Primern CD61-13 (5'-TTAGGGTTTTCACTCCACGC-3'; SEQ ID NO:3) und CD61-28 (5'-TCCCCTTTTTTTCCTTTCTCTC-3'; SEQ ID NO:4) mittels des üblichen PCR-Verfahrens isoliert und in den Plasmid-Vektor pGEM-4Z kloniert (GSET8). Zur Herstellung der Transformations-Konstrukte wurde die *Ls*-cDNA aus dem Plasmid GSET8 mit SalI/SstI (für Sense-Konstrukt) bzw. XbaI/SstI (für Antisense-Konstrukt) herausgeschnitten und in den XhoI/SstI (Sense-Konstrukt) bzw. XbaI/SstI (Antisense-Konstrukt) geschnittenen

Pflanzentransformationsvektor pBIR (Meissner, 1990, Dissertation, Universität zu Köln, Köln) ligiert. Bei den erhaltenen Klonen liegt die cDNA entweder in Sense- oder in Antisense-Orientierung zwischen dem Promotor und der Polyadenylierungsstelle des 35S-Gens des Blumenkohl-Mosaikvirus vor. Die erhaltenen Sense- bzw. Antisense-Plasmide wurden durch direkte Transformation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz und Shell *et. al.*, 1986, Mol. Gen. Genet., 204:383-396) eingeführt. Anschließend wurden die T-DNAs der beiden unterschiedlichen Konstrukte in Blattstücke von Tomate und Tabak nach Fillatti *et. al.*, 1987, Biotech., 5:726-730 transformiert. Verschiedene transgene Pflanzen, die ein *Ls*-Antisense-Konstrukt enthalten, zeigen eine Reduktion der Seitentriebbildung.

Beispiel 7

Isolierung eines *Ls*-verwandten Gens aus Löwenmaul (*Antirrhinum majus*)

Mit dem cDNA-Klon ET als Sonde wurde eine genomische Phagenbibliothek aus *Antirrhinum majus* durchmustert. Die Hybridisierung erfolgte bei 55°C, d.h. unter reduzierter Stringenz. In diesem Experiment wurden 14 Klone isoliert, von denen der Klon HH13, der die stärksten Hybridisierungssignale zeigte, weiter charakterisiert wurde. Die nach Umklonierung des Phageninserts in den Plasmidvektor pGEM-11Zf(+) durchgeführte Sequenzanalyse zeigte, daß das isolierte *Antirrhinum majus*-Gen hohe Sequenzähnlichkeit mit dem *Ls*-Gen aus der Tomate besitzt. Innerhalb der beiden Sequenzen konnten Bereiche identifiziert werden, in denen die abgeleitete Aminosäuresequenz vollständig konserviert ist.

Beispiel 8

Isolierung eines *Ls*-verwandten Gens aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

In einem Southern-Blot-Experiment unter reduzierter Stringenz bei 55°C mit der cDNA des *Ls*-Gens als Hybridisierungssonde konnte in genomischer DNA aus *Solanum tuberosum* ein DNA-Fragment nachgewiesen werden (siehe Abb. 4). Mit den genspezifischen Primern CD61-24 (5'-TTTCCCACTCAAGCCAAGCTC-3'; SEQ ID NO:5), CD61-6 (5'-GGTGGCAATGTAGCTTCCAG-3'; SEQ ID NO:6), PO1 (5'-TCGAGGCGTTGGATTATTATAC-3'; SEQ ID NO:7) und PO5 (5'-GGCCCCCATATCTTTTCC-3'; SEQ ID NO:8) aus dem *Ls*-Gen wurden mittels des PCR-Verfahrens überlappende genomische DNA-Fragmente aus in üblicher Weise isolierter

genomischer DNA von *Solanum tuberosum* isoliert. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Annealing bei 60°C für 1 Minute, Elongation bei 72°C für 2 Minuten. Dieser Zyklus wurde 30 mal wiederholt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den Plasmidvektor pGEM-T kloniert. Eine Sequenzanalyse ergab, daß die isolierten DNA-Fragmente aus *Solanum tuberosum* die Sequenzinformation für ein offenes Leseraster mit einer Kodierungskapazität von 431 Aminosäuren tragen (Abb. 6). Die DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO:9, die von der DNA-Sequenz codierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO:10 aufgeführt. Das *Ls*-homologe Gen der Kartoffel zeigt zum *Ls*-Gen der Tomate sowohl auf DNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine Sequenzidentität von etwa 98%.

Beispiel 9

Isolierung eines *Ls*-verwandten Gens aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung des *Ls*-homologen Gens aus *Arabidopsis thaliana* wurden die degenerierten Primer CD61-38 (5'-CARTGGCCNCCNYTNATGCA-3'; SEQ ID NO:11)* und CD61-41 (5'-TGRTTYTGCCANCCNARRAA-3'; SEQ ID NO:12)* hergestellt und für PCR-Reaktionen mit in üblicher Weise isolierter genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Annealing bei 50°C für 1 Minute, Elongation bei 72°C für 1 Minute. Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt. Auf diese Weise konnte ein DNA-Fragment von etwa 700 bp amplifiziert werden, das anschließend in den Plasmid-Vektor pGEM-T kloniert wurde. Eine Sequenzanalyse zeigte, daß das isolierte DNA-Fragment aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO:13) 687 bp lang war und eine hohe Sequenzähnlichkeit zum *Ls*-Gen aus *Lycopersicon esculentum* besitzt. Auf DNA-Ebene zeigt das *Arabidopsis thaliana*-DNA-Fragment zum *Ls*-Gen der Tomate eine Sequenzidentität von etwa 63 %. Auf Protein-Ebene sind etwa 55 % der Aminosäuren identisch. Die von dem isolierten DNA-Fragment (SEQ ID NO:13) codierte Aminosäuresequenz ist in SEQ ID NO:14 aufgeführt. Unter Verwendung des isolierten DNA-Fragments kann das *Ls*-homologe Gen aus *Arabidopsis thaliana* mittels der üblichen molekularbiologischen Standardmethoden isoliert werden.

* Bei der Beschreibung der degenerierten Primer wurde der WIPO Standard St. 23 verwendet:

R = A + G

N = A + G + C + T

Y = C + T

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Nikolaus (Klaus) Theres
(B) STRASSE: Schiffgesweg 30
(C) ORT: Pulheim
(D) BUNDESLAND: NRW
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 50259
(G) TELEFON: 02234-89386

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Anscissionszonenbildung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1729 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Lycopersicon esculentum

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCTCTGTCCT TCCCCCAGG TCCCCTTTTT TTCCTTTCTC TCTCTCCTTT ATTTCTCTTT	60
TCATAAGCAT ATTCTTTCTC TCTCTAGGGT TTTCACCTTC ACCTGAAATA GTGTTGTAA	120
ATTGAATGAT ATGTTAGGAT CCTTTGGTTC TTCATCATCT CAATCTCACC CTCATCATGA	180
TGAAGAATCT TCTGATCATC ATCAACAGCG TAGATTCACC GCTACTGCTA CAACTATCAC	240
CACCACCACC ATCACTACCT CACCAGCTAT TCAAATCCGC CAGCTACTCA TTAGCTGTGC	300
GGAGTTGATT TCGCAGTCCG ATTTCTCGGC CGCGAAAAGA CTCCTTACTA TATTATCAAC	360
TAACATCATCT CCTTTTGGTG ATTCAACTGA ACGGTTAGTC CATCAATTTA CTCGCGCACT	420
TTCCCTTCGT CTCAACCGCT ATATATCGTC AACCACCAAT CATTTCATGA CACCTGTTGA	480
AACAACCTCA ACTGATTCTT CTTCTTCGTC ATCATTAGCT CTAATTCAAT CATCATATCT	540

ATCTCTAAAC CAAGTTACCC CTTTCATAAG GTTTACTCAA TTAACCGCTA ATCAAGCGAT 600
TTTAGAAGCG ATTAACGGTA ATCATCAAGC AATCCACATC GTTGATTTCG ACATTAATCA 660
5 CGGGGTTCAA TGGCCACCGT TAATGCAAGC ACTAGCTGAT CGTTACCCTG CTCCCACTCT 720
TCGAATCACC GGTACTGGAA ATGACCTTGA TACCCTTCGT AGAACAGGTG ATCGTTTAGC 780
10 TAAATTTGCT CACTCATTAG GGTTGAGATT TCAATTCCAT CCTCTTTATA TAGCCAATAA 840
TAACCACGAT CACGATGAAG ATCCTTCTAT TATTTCTCTC ATTGTACTAC TCCCTGATGA 900
AACCCTAGCT ATCAACTGTG TTTTCTACCT CCACCGCCTT TAAAAGACC GCGAAAAGTT 960
15 AAGGATTTTT TTGCATAGGG TTAAGTCAAT GAACCTAAA ATTGTTACAA TCGCGGAGAA 1020
GGAAGCAAAT CATAACCATC CTCTTTTTTT ACAAAGATTC ATCGAGGCGT TGGATTATTA 1080
20 TACAGCTGTG TTTGATTAC TGAAGCTAC ATTGCCACCG GGTAGTCGAG AGAGGATGAC 1140
AGTTGAACAA GTGTGGTTTG GGAGAGAGAT TGTGATATC GTTGCGATGG AAGGAGATAA 1200
AAGGAAAGAA AGACATGAAA GGTTTAGATC ATGGGAAGTT ATGTTGAGGA GTTGTGGATT 1260
25 TAGTAATGTT GCTTTAAGCC CTTTGCATT ATCACAAGCT AAGCTTCTTT TGAGACTTCA 1320
TTATCCTTCT GAAGGCTATC AACTCGGAGT TTCGAGTAAT TCTTTCTTCT TAGGTTGGCA 1380
30 AAATCAACCC CTTTCTCCA TCTCGTCTTG GCGTTGAGAA AACTATCAA ATAGCCAACT 1440
TCAGAGGGTA ATTAAGACTA CTGATAGTTT AGGAGGGATC TGAAGAAAAC GCGTGGAGTG 1500
AAAACCCTAA ATAACCAGAT TTTCTAATGA AGTTGTAGTA GTAGAAATTT GCATGGTGAA 1560
35 GAACAATATT GAAGAGGTAT TGAAATTTC TGTTTTTTTT GTTTTACTTA TTGATATGAA 1620
TGTTTTAAAA TTTTAAACAT AGAGGACTAG GTTGATGATA TATAGTATTT AAGTTAACTA 1680
40 GTCTTTGTAT AACGCAAGAT CTTGATCAAC TTATTTTAT TTTTAATTA 1729

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 428 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: *Lycopersicon esculentum*
55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:
Met Leu Gly Ser Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gln Ser His Pro His His
1 5 10 15
60

[illegible]

25

Thr Val Glu Gln Val Trp Phe Gly Arg Glu Ile Val Asp Ile Val Ala
 340 345 350

Met Glu Gly Asp Lys Arg Lys Glu Arg His Glu Arg Phe Arg Ser Trp
 355 360 365

Glu Val Met Leu Arg Ser Cys Gly Phe Ser Asn Val Ala Leu Ser Pro
 370 375 380

Phe Ala Leu Ser Gln Ala Lys Leu Leu Leu Arg Leu His Tyr Pro Ser
 385 390 395 400

Glu Gly Tyr Gln Leu Gly Val Ser Ser Asn Ser Phe Phe Leu Gly Trp
 405 410 415

Gln Asn Gln Pro Leu Phe Ser Ile Ser Ser Trp Arg
 420 425

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTAGGGTTTT CACTCCACGC

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TCCCCTTTTT TTCCTTTCTC TC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TTTCCCACTC AAGCCAACTC

20

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

15 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

20 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGTGGCAATG TAGCTTCCAG

20

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

40

TCGAGGCGTT GGATTATTAT AC

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

45

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GGCCCCCATA TCTTTTTC

19

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1296 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

	ATGTTAGGAT CCTTTGGTTC TTCATCATCT CAATCTCACC CTCATCATGA TGAAGAATCT	60
20	TCTGATCATC ATCAACGGCG TAGATTCACC GCTACTACTA CAACTATCAC CACCACCACC	120
	ACAACGACCT CACCAGCTAT TCAAATCCGC CAGCTACTCA TTAGCTGTGC GGAGTTGATT	180
25	TCGCGGTCCG ATTTCTCGGC CGCGAAAAGA CTCCTTACCA TATTATCAAC TAACTCTTCT	240
	CCTTTTGGTG ATTCAACTGA ACGGTTAGTC CATCAGTTTA CTCGCGCACT TTCCCTTCGT	300
	CTCAACCGCT ATATATCGTC AACCACCAAT CATTTTCATGA CACCTGTTGA AACAACTCCA	360
30	ACTGATTCTT CATCTTCGTT GCCATCGTCA TCATTAGCTC TAATTCAATC ATCATATCAT	420
	TCTCTAAATC AAGTTACCCC TTTTATAAGG TTTACTCAAT TAACCGCTAA TCAAGCGATT	480
35	TTAGAAGCGA TTAACGGTAA TCATCAAGCA ATCCACATCG TTGATTTCTGA CATTAATCAC	540
	GGGGTTCAAT GGCCACCGTT AATGCAAGCA CTAGCTGATC GTTACCCTGC TCCTACTCTT	600
	CGAATCACCG GTACTGGAAA TGACCTTGAT ACCCTTCGTA GAACAGGTGA TCGTTTAGCT	660
40	AAATTTGCTC ACTCATTAGG GTTGAGATTT CAATTCCATC CTCTTTATAT CGCCAATAAT	720
	AACCGCGATC ACGGTGAAGA TCCTTCTATT ATTTCTCCA TTGTACTTCT CCCTGATGAA	780
45	ACCCTAGCTA TCAACTGTGT TTTCTATCTC CACCGCCTTT TAAAAGACCG CGAAAAATTA	840
	AGGATTTTTT TGCATAGGGT TAAGTCAATG AACCTAAAA TTGTTACAAT CGCGGAGAAG	900
	GAAGCAAATC ATAACCATCC TCTTTTTTTA CAAAGATTTA TCGAGGCGTT GGATTATTAT	960
50	ACAGCTGTGT TTGATTCATT GGAAGCTACA TTGCCACCGG GTAGTCGTGA GAGGATGACA	1020
	GTTGAACAAG TGTGGTTTGG GAGAGAAATT GTTGATATCG TGGCGATGGA AGGAGATAAA	1080
55	AGGAAAGAAA GACATGAAAG GTTTAGATCA TGGGAAGTTA TGTTGAGGAG TTGTGGATTT	1140
	AGTAATGTTG CTTTAAGCCC TTTTGCAATTA TCACAAGCTA AGCTTCTTTT GAGACTACAT	1200
	TATCCTTCTG AAGGCTATCA ACTCGGAGTT TCGAGTAATT CTTTCTTCTT AGGTTGGCAA	1260
60	AATCAACCTC TTTTCTCCAT CTCGTCTTGG CGTTGA	1296

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 431 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Leu Gly Ser Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gln Ser His Pro His His
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ser Ser Asp His His Gln Arg Arg Arg Phe Thr Ala Thr
 20 20 25 30
 Thr Thr Thr Ile Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Pro Ala Ile Gln
 25 35 40 45
 Ile Arg Gln Leu Leu Ile Ser Cys Ala Glu Leu Ile Ser Arg Ser Asp
 50 55 60
 Phe Ser Ala Ala Lys Arg Leu Leu Thr Ile Leu Ser Thr Asn Ser Ser
 30 65 70 75 80
 Pro Phe Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Val His Gln Phe Thr Arg Ala
 35 85 90 95
 Leu Ser Leu Arg Leu Asn Arg Tyr Ile Ser Ser Thr Thr Asn His Phe
 100 105 110
 Met Thr Pro Val Glu Thr Thr Pro Thr Asp Ser Ser Ser Ser Leu Pro
 40 115 120 125
 Ser Ser Ser Leu Ala Leu Ile Gln Ser Ser Tyr His Ser Leu Asn Gln
 130 135 140
 Val Thr Pro Phe Ile Arg Phe Thr Gln Leu Thr Ala Asn Gln Ala Ile
 45 145 150 155 160
 Leu Glu Ala Ile Asn Gly Asn His Gln Ala Ile His Ile Val Asp Phe
 165 170 175
 Asp Ile Asn His Gly Val Gln Trp Pro Pro Leu Met Gln Ala Leu Ala
 50 180 185 190
 Asp Arg Tyr Pro Ala Pro Thr Leu Arg Ile Thr Gly Thr Gly Asn Asp
 55 195 200 205
 Leu Asp Thr Leu Arg Arg Thr Gly Asp Arg Leu Ala Lys Phe Ala His
 210 215 220
 Ser Leu Gly Leu Arg Phe Gln Phe His Pro Leu Tyr Ile Ala Asn Asn
 60

	225		230		235		240									
	Asn	Arg	Asp	His	Gly	Glu	Asp	Pro	Ser	Ile	Ile	Ser	Ser	Ile	Val	Leu
					245					250					255	
5	Leu	Pro	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ile	Asn	Cys	Val	Phe	Tyr	Leu	His	Arg
				260					265					270		
10	Leu	Leu	Lys	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	His	Arg	Val	Lys
			275					280					285			
	Ser	Met	Asn	Pro	Lys	Ile	Val	Thr	Ile	Ala	Glu	Lys	Glu	Ala	Asn	His
	290						295					300				
15	Asn	His	Pro	Leu	Phe	Leu	Gln	Arg	Phe	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Tyr	Tyr
	305					310					315				320	
	Thr	Ala	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Glu	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg
				325					330						335	
20	Glu	Arg	Met	Thr	Val	Glu	Gln	Val	Trp	Phe	Gly	Arg	Glu	Ile	Val	Asp
			340						345					350		
	Ile	Val	Ala	Met	Glu	Gly	Asp	Lys	Arg	Lys	Glu	Arg	His	Glu	Arg	Phe
25			355					360					365			
	Arg	Ser	Trp	Glu	Val	Met	Leu	Arg	Ser	Cys	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Ala
	370						375					380				
30	Leu	Ser	Pro	Phe	Ala	Leu	Ser	Gln	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Arg	Leu	His
	385					390					395				400	
	Tyr	Pro	Ser	Glu	Gly	Tyr	Gln	Leu	Gly	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Phe	Phe
				405					410						415	
35	Leu	Gly	Trp	Gln	Asn	Gln	Pro	Leu	Phe	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp	Arg	
			420					425						430		

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

45 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CARTGGCCNC CNYTNATGCA

20

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

60

- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

10 TGRTTYTGCC ANCCNARRAA

20

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 687 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

20 (C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Arabidopsis thaliana*

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GAGAGGTCAT CAAACCCTAG CAGTCCACCT CCATCTCTCC GCATAACCGG ATGCGGTCTGA 60
GATGTAACCG GATTAAACCG AACTGGAGAC CGGTAAACCC GGTTCGCTGA CTCTTTAGGT 120
35 CTCCAATTCC AGTTTCACAC GCTAGTGATC GTAGAAGAAG ATCTCGCCGG ACTTTTGCTA 180
CAGATCCGAT TGTTAGCTCT CTCAGCCGTA CAAGGAGAGA CCATTGCCGT CAATTGTGTT 240
40 CACTTCCTCC ACAAATATT TAACGACGAT GGAGATATGA TCGGTCACCT CTTGTCAGCG 300
ATCAAGAGCT TAAACTCTAG AATCGTTACA ATGGCAGAGA GAGAAGCTAA TCATGGAGAT 360
CACTCGTTCT TGAATAGATT CTCTGAGGCA GTGGATCATT ACATGGCGAT CTTTGATTCTG 420
45 TTGGAAGCGA CGTTGCCGCC AAATAGCCGA GAGAGACTAA CCCTAGAGCA ACGGTGGTTC 480
GGTAAGGAGA TTTTGGATGT TGTGGCGGCG GAAGAGACGG AGAGAAAGCA AAGACATCGG 540
50 AGGTTTGAGA TTTGGGAAGA GATGATGAAG AGGTTTGTT TCGTTAACGT TCCTATTGGA 600
AGCTTTGCTT TGTCTCAAGC TAAGCTTCTT CTTAGACTTC ATTATCTTTC AGAAGGTTAT 660
AATCTTCAGT TCCTTAACAA TTCTTTG 687

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

60 (A) LÄNGE: 229 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Arabidopsis thaliana*

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Glu Arg Ser Ser Asn Pro Ser Ser Pro Pro Pro Ser Leu Arg Ile Thr
1 5 10 15

15 Gly Cys Gly Arg Asp Val Thr Gly Leu Asn Arg Thr Gly Asp Arg Leu
20 25 30

Thr Arg Phe Ala Asp Ser Leu Gly Leu Gln Phe Gln Phe His Thr Leu
35 40 45

20 Val Ile Val Glu Glu Asp Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gln Ile Arg Leu
50 55 60

Leu Ala Leu Ser Ala Val Gln Gly Glu Thr Ile Ala Val Asn Cys Val
25 65 70 75 80

His Phe Leu His Lys Ile Phe Asn Asp Asp Gly Asp Met Ile Gly His
85 90 95

30 Phe Leu Ser Ala Ile Lys Ser Leu Asn Ser Arg Ile Val Thr Met Ala
 100 105 110

Glu Arg Glu Ala Asn His Gly Asp His Ser Phe Leu Asn Arg Phe Ser
115 120 125

35
Glu Ala Val Asp His Tyr Met Ala Ile Phe Asp Ser Leu Glu Ala Thr
130 135 140

Leu Pro Pro Asn Ser Arg Glu Arg Leu Thr Leu Glu Gln Arg Trp Phe
40 145 150 155 160

Gly Lys Glu Ile Leu Asp Val Val Ala Ala Glu Glu Thr Glu Arg Lys
165 170 175

45 Gln Arg His Arg Arg Phe Glu Ile Trp Glu Glu Met Met Lys Arg Phe
 180 185 190

Gly Phe Val Asn Val Pro Ile Gly Ser Phe Ala Leu Ser Gln Ala Lys
195 200 205

50
Leu Leu Leu Arg Leu His Tyr Pro Ser Glu Gly Tyr Asn Leu Gln Phe
210 215 220

55 Leu Asn Asn Ser Leu
 225

Patentansprüche

1. Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich ist, deren Fragment oder Derivat oder eine Nukleotidsequenz, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 hybridisiert und für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich ist.
2. Nukleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei die hybridisierende Nukleotidsequenz unter stringenten Bedingungen mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO:1, 9 oder 13 hybridisiert.
3. Nukleotidsequenz wie in der SEQ ID NO:1, 9 oder 13 aufgeführt.
4. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID NO:2, 10 oder 14 aufgeführt.
5. Vektor, umfassend eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Transformierte Pflanzenzelle oder transformiertes Pflanzengewebe, dadurch gekennzeichnet, daß eine für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat nach Anspruch 1 oder 2 stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist.
7. Pflanzenzelle oder Pflanzengewebe nach Anspruch 6, regenerierbar zu einer Samenproduzierenden Pflanze.
8. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, umfassend das stabile Integrieren mindestens einer für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen exprimierbaren DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat nach Anspruch 1 oder 2 in das Genom von Pflanzenzellen oder

Pflanzengewebe und Regeneration der erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen.

5 9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zum Integrieren eine DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat verwendet wird, die die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung unterdrückt.

10 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Antisense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

15 11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

20 12. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung durch ein Ribozym, umfassend die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat, unterdrückt wird.

25 13. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in den genomischen Bereich des homologen endogenen Gens durch homologe Rekombination integriert wird.

30 14. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zum Integrieren eine DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat verwendet wird, die die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verstärkt.

35 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei als Pflanze eine Tomatenpflanze, eine Rapspflanze, eine Kartoffelpflanze oder eine Löwenmaulpflanze oder deren Zelle oder Gewebe verwendet wird.

5 17. Pflanze, erhältlich nach einem der Ansprüche 8 bis 16.

18. Saatgut, erhalten von Pflanzen nach Anspruch 17.

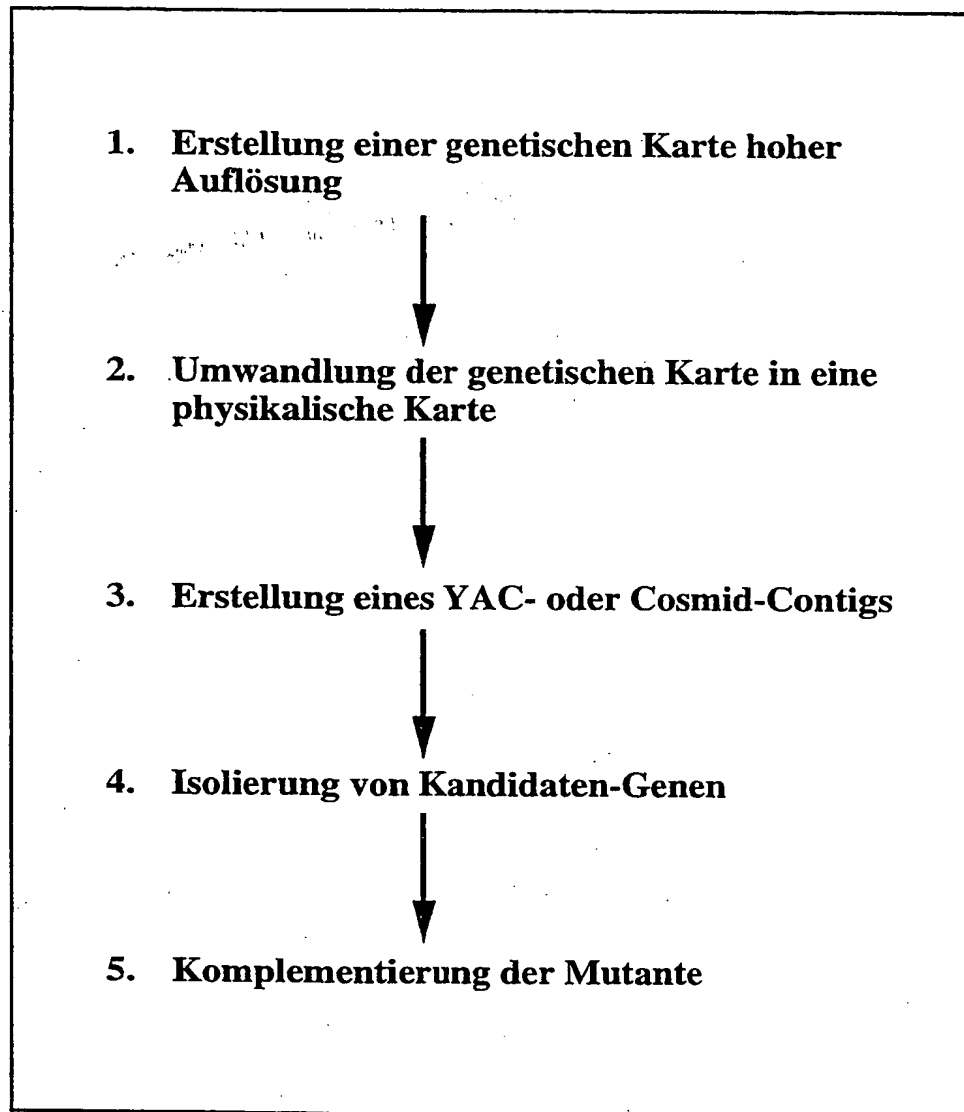


Abb. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

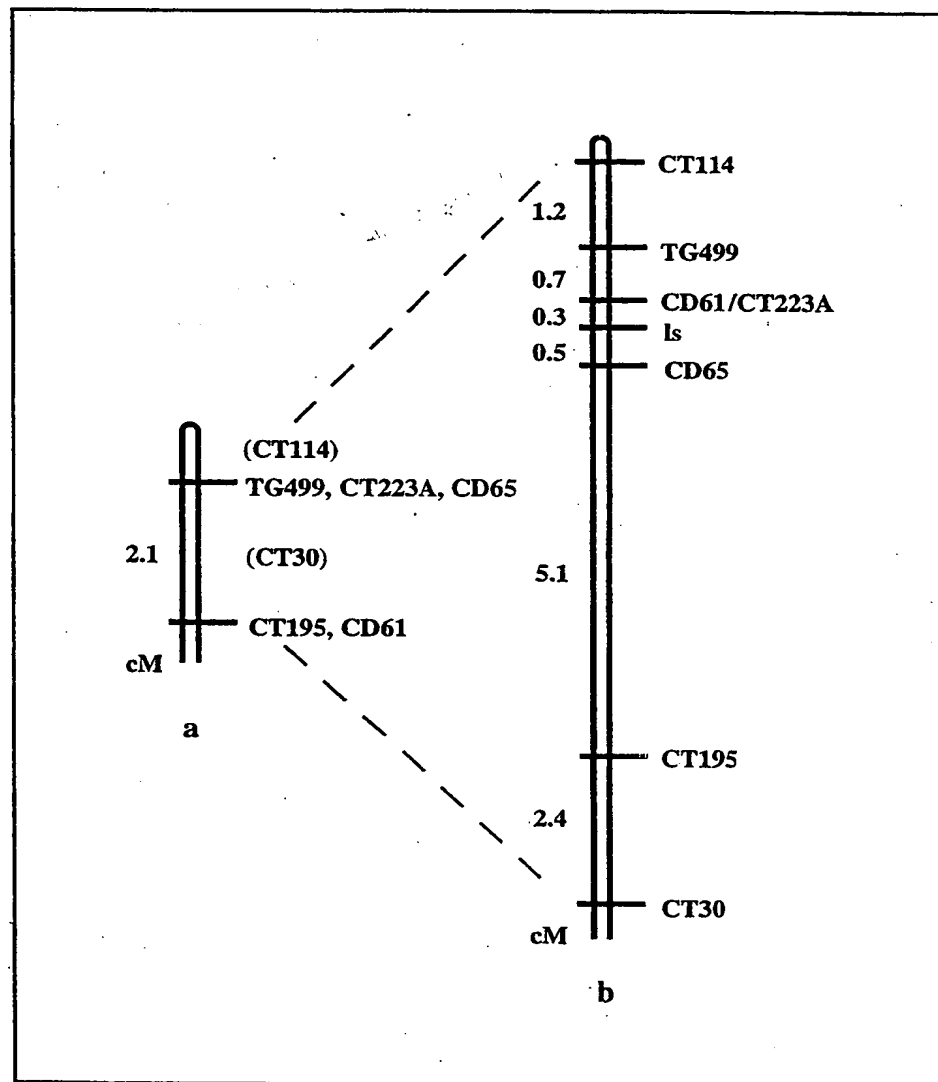


Abb. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/10

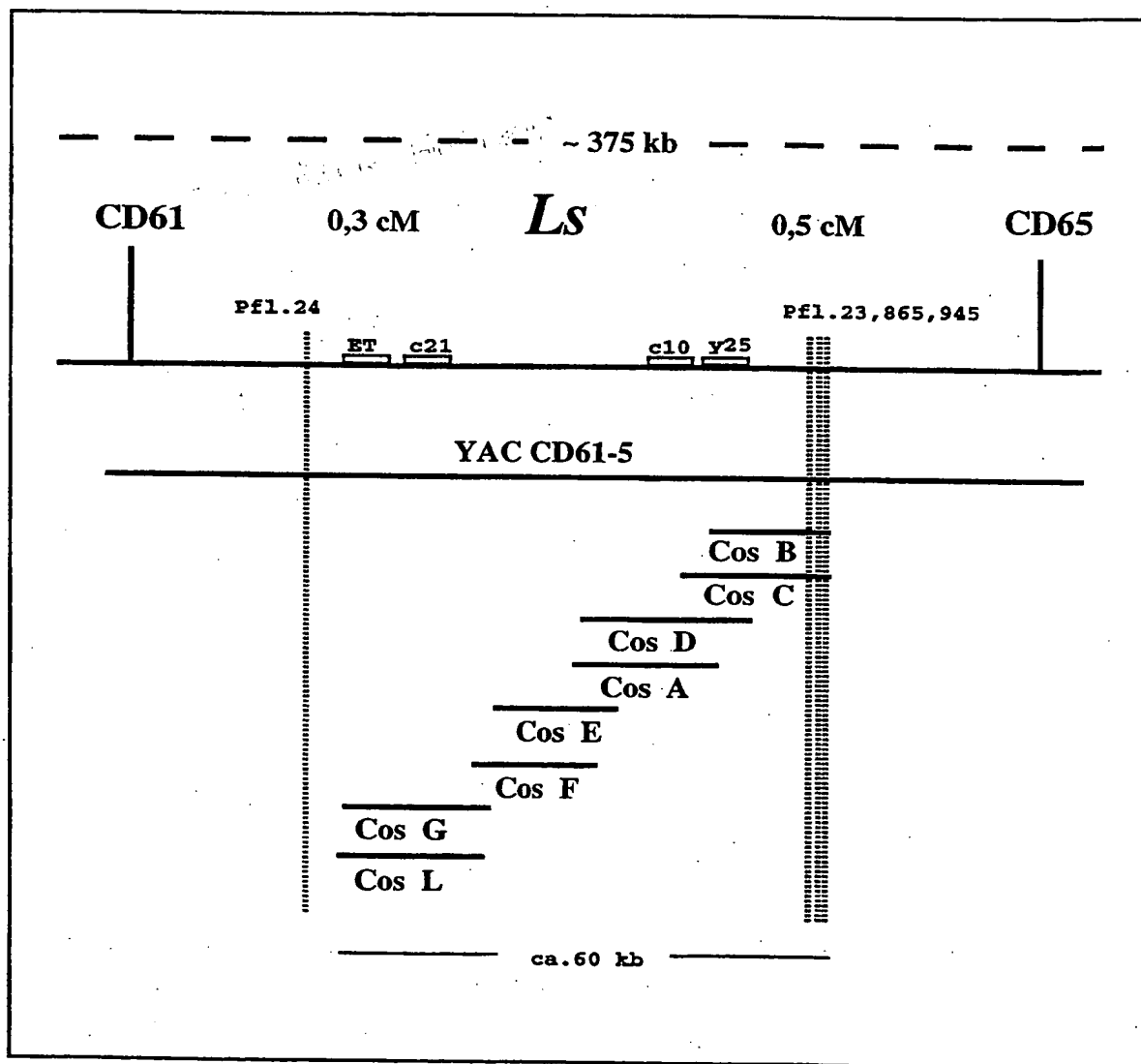


Abb. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/10

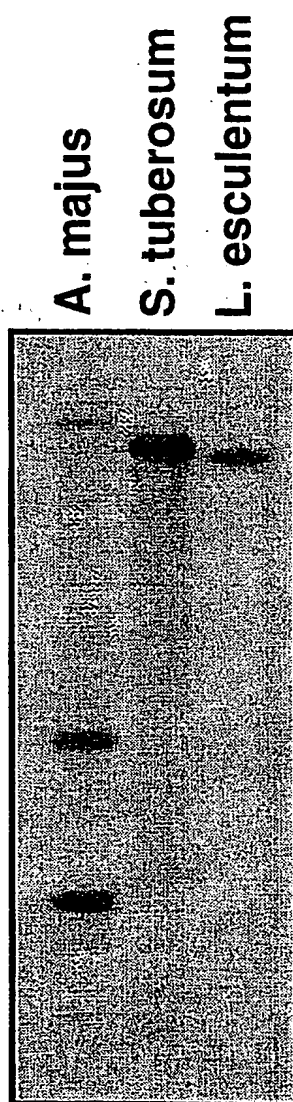


Abb. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 CCTCTGTCCTTCCCCCAGGTCCCCTTTTTTTCCTTCTCTCTCCTTTATTTCTCTTT 60
 61 TCATAAGCATATTCTTTCTCTCTCTAGGGTTTTCACTTTTCACCTGAAATAGTGTGTAA 120
 121 ATTGAATGATATGTTAGGATCCTTTGGTTCTTCATCATCTCAATCTCACCTCATCATGA 180
 M L G S F G S S S S Q S H P H H D
 181 TGAAGAATCTTCTGATCATCATCAACAGCGTAGATTACCGCTACTGCTACAACATCAC 240
 E E S S D H H Q Q R R F T A T A T T I T
 241 CACCACCACCATCACTACCTCACCAGCTATTCAAATCCGCCAGCTACTCATTAGCTGTGC 300
 T T T I T T S P A I Q I R Q L L I S C A
 301 GGAGTTGATTTGCGAGTCCGATTTCTCGGCCGCGAAAAGACTCCTTACTATATTATCAAC 360
 E L I S Q S D F S A A K R L L T I L S T
 361 TAACTCATCTCCTTTTGGTGATTCAACTGAACGGTTAGTCCATCAATTTACTCGCGCACT 420
 N S S P F G D S T E R L V H Q F T R A L
 421 TTCCCTTCGTCTCAACCGCTATATATCGTCAACCACCAATCATTTTCATGACACCTGTTGA 480
 S L R L N R Y I S S T T N H F M T P V E
 481 AACAACTCCAAC TGATTCTTCTTCTTCGTATCATATTAGCTCTAATTCAATCATCATATCT 540
 T T P T D S S S S S S L A L I Q S S Y L
 541 ATCTCTAAACCAAGTTACCCCTTTTCATAAGGTTTACTCAATTAACCGCTAATCAAGCGAT 600
 S L N Q V T P F I R F T Q L T A N Q A I
 601 TTTAGAAGCGATTAAACGGTAATCATCAAGCAATCCACATCGTTGATTTGACATTAAATCA 660
 L E A I N G N H Q A I H I V D F D I N H
 661 CGGGGTTCAATGGCCACCGTTAATGCAAGCACTAGCTGATCGTTACCTGCTCCCACTCT 720
 G V Q W P P L M Q A L A D R Y P A P T L
 721 TCGAATCACCGGTACTGGAATGACCTTGATACCCTTCGTAGAACAGGTGATCGTTTAGC 780
 R I T G T G N D L D T L R R T G D R L A
 781 TAAATTTGCTCACTCATTAGGGTTGAGATTTCAATTCCATCCTCTTTATATAGCCAATAA 840
 K F A H S L G L R F Q F H P L Y I A N N
 841 TAACCACGATCAGATGAAGATCCTTCTATTATTTCTCCATTGTACTACTCCCTGATGA 900
 N H D H D E D P S I I S S I V L L P D E
 901 AACCTAGCTATCAACTGTGTTTTCTACCTCCACCGCCTTTTAAAGACCGCGAAAAGTT 960
 T L A I N C V F Y L H R L L K D R E K L
 961 AAGGATTTTTTTTGCATAGGGTTAAGTCAATGAACCCTAAAATTGTTACAATCGCGGAGAA 1020
 R I F L H R V K S M N P K I V T I A E K
 1021 GGAAGCAAATCATAACCATCCTCTTTTTTTTACAAAGATTCATCGAGGCGTTGGATTATTA 1080

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E A N H N H P L F L Q R F I E A L D Y Y
1081 TACAGCTGTGTTTGGATTCACTGGAAGCTACATTGCCACCGGGTAGTCGAGAGAGGATGAC 1140
T A V F D S L E A T L P P G S R E R M T
1141 AGTTGAACAAGTGTGGTTTGGGAGAGAGATTGTTGATATCGTTGCGATGGAAGGAGATAA 1200
V E Q V W F G R E I V D I V A M E G D K
1201 AAGGAAAGAAAGACATGAAAGGTTTAGATCATGGGAAGTTATGTTGAGGAGTTGTGGATT 1260
R K E R H E R F R S W E V M L R S C G F
1261 TAGTAATGTTGCTTTAAGCCCTTTTGCAATTATCACAAGCTAAGCTTCTTTTGAGACTTCA 1320
S N V A L S P F A L S Q A K L L L R L H
1321 TTATCCTTCTGAAGGCTATCAACTCGGAGTTTCGAGTAATTCTTTCTTCTTAGGTTGGCA 1380
Y P S E G Y Q L G V S S N S F F L G W Q
1381 AAATCAACCCCTTTTCTCCATCTCGTCTTGGCGTTGAGAAAACTATCAAATAGCCAACT 1440
N Q P L F S I S S W R
1441 TCAGAGGGTAATTAAGACTACTGATAGTTTAGGAGGGATCTGAAGAAAACGCGTGGAGTG 1500
1501 AAAACCTAAATAACCAGATTTTCTAATGAAGTTGTAGTAGTAGAAATTGTCATGGTGAA 1560
1561 GAACAATATTGAAGAGGTATTGAAATTTTCATGTTTTTTTTGTTTTACTTATTGATATGAA 1620
1621 TGTTTTAAAATTTTAAACATAGAGGACTAGGTTGATGATATATAGTATTTAAGTTAACTA 1680
1681 GTCTTTGTATAACGCAAGATCTTGATCAACTTATTTTTATTTTTAATTA 1729

Abb. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 ATGTTAGGATCCTTTGGTTCTTCATCATCTCAATCTCACCTCATCATGATGAAGAATCT 60
1 M L G S F G S S S S Q S H P H H D E E S 20
61 TCTGATCATCATCAACGGCGTAGATTACCGCTACTACTACAACATATCACCACCACCACC 120
21 S D H H Q R R R F T A T T T T I T T T T 40
121 ACAACGACCTCACCAGCTATTCAAATCCGCCAGCTACTCATTAGCTGTGCGGAGTTGATT 180
41 T T T S P A I Q I R Q L L I S C A E L I 60
181 TCGCGGTCCGATTTCTCGGCCGCGAAAAGACTCCTTACCATATTATCAACTAACTCTTCT 240
61 S R S D F S A A K R L L T I L S T N S S 80
241 CCTTTTGGTGATTCAACTGAACGGTTAGTCCATCAGTTTACTCGCGCACTTTCCTTTCGT 300
81 P F G D S T E R L V H Q F T R A L S L R 100
301 CTCAACCGCTATATATCGTCAACCACCAATCATTTTCATGACACCTGTTGAAACAACCTCCA 360
101 L N R Y I S S T T N H F M T P V E T T P 120
361 ACTGATTCTTCATCTTCGTTGCCATCGTCATCATTAGCTCTAATTCAATCATCATATCAT 420
121 T D S S S S L P S S S L A L I Q S S Y H 140
421 TCTCTAAATCAAGTTACCCCTTTTATAAGGTTTACTCAATTAACCGCTAATCAAGCGATT 480
141 S L N Q V T P F I R F T Q L T A N Q A I 160
481 TTAGAAGCGATTAAACGGTAATCATCAAGCAATCCACATCGTTGATTTGACATTAATCAC 540
161 L E A I N G N H Q A I H I V D F D I N H 180
541 GGGGTTCAATGGCCACCGTTAATGCAAGCACTAGCTGATCGTTACCCTGCTCCTACTCTT 600
181 G V Q W P P L M Q A L A D R Y P A P T L 200
601 CGAATCACCGGTACTGGAAATGACCTTGATACCCTTCGTAGAACAGGTGATCGTTTAGCT 660
201 R I T G T G N D L D T L R R T G D R L A 220
661 AAATTGCTCACTCATTAGGGTTGAGATTTCAATTCCATCCTCTTTATATCGCCAATAAT 720
221 K F A H S L G L R F Q F H P L Y I A N N 240
721 AACCGCGATCACGGTGAAGATCCTTCTATTATTTCTCCATTGTACTTCTCCCTGATGAA 780
241 N R D H G E D P S I I S S I V L L P D E 260
781 ACCCTAGCTATCAACTGTGTTTTCTATCTCCACCGCCTTTTAAAAGACCGCGAAAAATTA 840
261 T L A I N C V F Y L H R L L K D R E K L 280

Abb. 6 Forts.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/10

841 AGGATTTTTTTTGCATAGGGTTAAGTCAATGAACCCTAAAATTGTTACAATCGCGGAGAAG 900
281 R I F L H R V K S M N P K I V T I A E K 300
901 GAAGCAAATCATAACCATCCTCTTTTTTTTACAAAGATTTATCGAGGCGTTGGATTATTAT 960
301 E A N H N H P L F L Q R F I E A L D Y Y 320
961 ACAGCTGTGTTTGATTTCATTGGAAGCTACATTGCCACCGGGTAGTCGTGAGAGGATGACA 1020
321 T A V F D S L E A T L P P G S R E R M T 340
1021 GTTGAACAAGTGTGGTTTGGGAGAGAAATTGTTGATATCGTGGCGATGGAAGGAGATAAA 1080
341 V E Q V W F G R E I V D I V A M E G D K 360
1081 AGGAAAGAAAGACATGAAAGGTTTAGATCATGGGAAGTTATGTTGAGGAGTTGTGGATTT 1140
361 R K E R H E R F R S W E V M L R S C G F 380
1141 AGTAATGTTGCTTTAAGCCCTTTTGCATTATCACAAGCTAAGCTTCTTTTGAGACTACAT 1200
381 S N V A L S P F A L S Q A K L L L R L H 400
1201 TATCCTTCTGAAGGCTATCAACTCGGAGTTTCGAGTAATTCTTTCTTCTTAGGTTGGCAA 1260
401 Y P S E G Y Q L G V S S N S F F L G W Q 420
1261 AATCAACCTCTTTTCTCCATCTCGTCTTGGCGTTGA 1296
421 N Q P L F S I S S W R * 432

Abb. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/10

1 GAGAGGTCATCAAACCCTAGCAGTCCACCTCCATCTCTCCGCATAACCGGATGCGGTCGA 60
E R S S N P S S P P P S L R I T G C G R
61 GATGTAACCGGATTAAACCGAACTGGAGACCGGTTAACCCGGTTCGCTGACTCTTTAGGT 120
D V T G L N R T G D R L T R F A D S L G
121 CTCCAATTCCAGTTTCACACGCTAGTGATCGTAGAAGAAGATCTCGCCGGACTTTTGCTA 180
L Q F Q F H T L V I V E E D L A G L L L
181 CAGATCCGATTGTTAGCTCTCTCAGCCGTACAAGGAGAGACCATTGCCGTCAATTGTGTT 240
Q I R L L A L S A V Q G E T I A V N C V
241 CACTTCCTCCACAAAATATTTAACGACGATGGAGATATGATCGGTCACTTCTTGTGTCAGCG 300
H F L H K I F N D D G D M I G H F L S A
301 ATCAAGAGCTTAAACTCTAGAATCGTTACAATGGCAGAGAGAGAAGCTAATCATGGAGAT 360
I K S L N S R I V T M A E R E A N H G D
361 CACTCGTTCTTGAATAGATTCTCTGAGGCAGTGGATCATTACATGGCGATCTTTGATTG 420
H S F L N R F S E A V D H Y M A I F D S
421 TTGGAAGCGACGTTGCCGCCAAATAGCCGAGAGAGACTAACCCTAGAGCAACGGTGGTTC 480
L E A T L P P N S R E R L T L E Q R W F
481 GGTAAGGAGATTTTGGATGTTGTGGCGCGGAAGAGACGGAGAGAAAAGCAAAGACATCGG 540
G K E I L D V V A A E E T E R K Q R H R
541 AGGTTTGAGATTTGGGAAGAGATGATGAAGAGGTTTGGTTTCGTTAACGTTCCCTATTGGA 600
R F E I W E E M M K R F G F V N V P I G
601 AGCTTTGCTTTGTCTCAAGCTAAGCTTCTTCTTAGACTTCATTATCCTTCAGAAGGTTAT 660
S F A L S Q A K L L L R L H Y P S E G Y
661 AATCTTCAGTTCCTTAACAATTCTTTG 687
N L Q F L N N S L

Abb. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/10

1	LsAt	1	MLGSFGSSSSQSHPHHDEESSDDHHQ	RRFTAT	TTTTTT	TTSPAIQIRQLLISCAELI	1	
1	Lsle	1	MLGSFGSSSSQSHPHHDEESSDDHHQ	RRFTAT	TTTTTT	TTSPAIQIRQLLISCAELI	1	
1	LsSt	1	MLGSFGSSSSQSHPHHDEESSDDHHQ	RRFTAT	TTTTTT	TTSPAIQIRQLLISCAELI	1	
1	LsAt	1	SSDFSAAKRLLTILSTNSSPFGDSTERLVHQFTRALSRLNRYISSSTTNHFMTPVETTP				1	
61	Lsle	61	SSDFSAAKRLLTILSTNSSPFGDSTERLVHQFTRALSRLNRYISSSTTNHFMTPVETTP				61	
61	LsSt	61	SSDFSAAKRLLTILSTNSSPFGDSTERLVHQFTRALSRLNRYISSSTTNHFMTPVETTP				61	
1	LsAt	1	TDSSSS	SSSLALIQSSY	SLNQVTPFI	RFTQLTANQAILEAINGNHQAIHIVDFDINH	1	
121	Lsle	121	TDSSSS	SSSLALIQSSY	SLNQVTPFI	RFTQLTANQAILEAINGNHQAIHIVDFDINH	121	
121	LsSt	121	TDSSSS	SSSLALIQSSY	SLNQVTPFI	RFTQLTANQAILEAINGNHQAIHIVDFDINH	121	
1	LsAt	1	GVQWPP	MLQALADRY	PAPTLRITG	GRDRTG	LV	1
178	Lsle	178	GVQWPP	MLQALADRY	PAPTLRITG	GRDRTG	LV	178
181	LsSt	181	GVQWPP	MLQALADRY	PAPTLRITG	GRDRTG	LV	181
54	LsAt	54	DLAGLLQIRLLA	ISA	VOGETA	INC	VHELH	1
238	Lsle	238	NHDPED	PSIISSIVLLPDET	LA	INC	VCVFLHRL	1
241	LsSt	241	NHDPED	PSIISSIVLLPDET	LA	INC	VCVFLHRL	1
114	LsAt	114	REANHGDHS	FLNRF	SEADHY	MAFDS	LEATLPPN	1
297	Lsle	297	KEANHNNHPL	FLQRFIE	ALDYTA	VDFS	LEATLPPG	1
300	LsSt	300	KEANHNNHPL	FLQRFIE	ALDYTA	VDFS	LEATLPPG	1
174	LsAt	174	ERK	RHR	RFEI	WEEM	RFRF	1
357	Lsle	357	KRKERHER	FRS	WEV	MLR	SCGFS	1
360	LsSt	360	KRKERHER	FRS	WEV	MLR	SCGFS	1

Abb. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/29, 15/82, 5/10, C07K 14/415, A01H 5/00, 5/10		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/46759
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	22. Oktober 1998 (22.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/01070 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. April 1998 (15.04.98) (30) Prioritätsdaten: 197 15 700.9 15. April 1997 (15.04.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: THERES, Nikolaus [DE/DE]; Schiffgesweg 30, D-50259 Pulheim (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 28. Januar 1999 (28.01.99)	
(54) Title: PLANTS WITH CONTROLLED SIDE-SHOOT FORMATION AND/OR CONTROLLED ABSCISSION AREA FORMATION			
(54) Bezeichnung: PFLANZEN MIT GESTEUERTER SEITENTRIEBBILDUNG UND/ODER GESTEUERTER ABSCISSIONSZONENBILDUNG			
(57) Abstract <p>Disclosed are nucleotide sequences coding polypeptides which are responsible for controlling side-shoot formation and/or petal formation and/or abscission area formation, in addition to polypeptide and amino acid sequences coded by nucleotide sequences. Disclosed are also plants with controlled side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas, wherein the expressible DNA sequence, fragment or derivative thereof responsible for side-shoot formation and/or petal formation and/or abscission area formation is integrated in a stable manner into the genome of the plant cell or the plant tissue. Further disclosed are methods for the production of plants with controlled side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas, wherein the expressible DNA sequence or fragment or derivative thereof responsible for side-shoot formation and/or petal formation and/or controlled formation of abscission areas is integrated in a stable manner into the genome of plant cells or plant tissue and the plant cells or plant tissue thus obtained is regenerated to form plants. The invention also relates to plants and the seeds of plants which can be obtained according to the inventive method.</p>			
(57) Zusammenfassung <p>Beschrieben sind Nukleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind sowie die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen. Beschrieben sind weiterhin Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Beschrieben sind ferner Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Petalenbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe integriert werden und die erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden. Darüberhinaus sind Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen beschrieben, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.</p>			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/01070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/29 C12N15/82 C12N5/10 C07K14/415 A01H5/00
A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MANDEL A. AND YANOFISKY M.: "A gene triggering flower formation in Arabidopsis" NATURE, vol. 377, 12 October 1995, pages 522-524, XP002081234 see the whole document	1,5-15, 17,18
X	SZYMKOWIAK E J ET AL: "Effect of lateral suppressor on petal initiation in tomato." PLANT JOURNAL, (1993 JUL) 4 (1) 1-7. JOURNAL CODE: BRU. ISSN: 0960-7412., XP002081235 cited in the application see the whole document	17,18
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 1998

Date of mailing of the international search report

30/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/01070

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHUMACHER K. ET AL.: "Genetic and physical mapping of the lateral suppressor (ls) locus in tomato."</p> <p>MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, (1995 MAR 20) 246 (6) 761-6. JOURNAL CODE: NGP.</p> <p>ISSN: 0026-8925., XP002081236</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	1-18

THIS PAGE BLANK (USPTO)